

文章编号:1000-5404(2013)13-1353-04

论著

人参皂甙 Rg3 抑制人结肠癌细胞生长与 Wnt/ β -catenin 信号的关系

车章洪¹,何百成² (401326 重庆,重庆市九龙坡区西南铝医院药剂科¹; 400016 重庆,重庆医科大学药理学教研室²)

[摘要] **目的** 研究人参皂甙 Rg3 对结肠癌细胞的增殖抑制作用与 Wnt/ β -catenin 信号转导的关系。**方法** 将结肠癌细胞分为对照组和用不同浓度 Rg3 处理组。采用结晶紫染色法及集落形成实验检测 Rg3 对 HCT116 细胞增殖的抑制作用。利用荧光素酶报告质粒检测 Rg3 对 HCT116 细胞中 β -catenin/Tcf4 转录活性的影响。采用 Western blot 法检测 β -catenin 及 c-Myc 蛋白表达;利用免疫荧光检测 Rg3 对结肠细胞 SW480 中 β -catenin 核转移的抑制作用。**结果** Rg3 在 60 $\mu\text{mol/L}$ 时就能明显抑制细胞增殖($P < 0.05$),集落形成实验结果呈现相同的变化趋势。荧光素酶报告质粒检测结果显示,Rg3 在 25 $\mu\text{mol/L}$ 时就能明显降低 HCT116 细胞中 β -catenin/Tcf4 的转录活性($P < 0.05$),并降低 c-Myc 蛋白表达,但对 β -catenin 蛋白表达无明显影响。免疫荧光检测结果显示,Rg3 能明显抑制 SW480 细胞中 β -catenin 的核转移。**结论** Rg3 能抑制人结肠癌细胞增殖,其机制可能与 Rg3 抑制 β -catenin 的核转移,进而抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导有关。

[关键词] 人参皂甙 Rg3;结肠癌细胞;增殖抑制; β -catenin;核转移

[中图分类号] R285.5; R394.3; R735.35

[文献标志码] A

Ginsenoside Rg3 exerts anti-proliferation effect on human colon cancer cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway

Che Zhanghong¹, He Baicheng² (¹Department of Pharmacy, Southwest Aluminum Hospital of Jiulongpo District, Chongqing, 401326; ²Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between the anti-proliferation effect of ginsenoside Rg3 on colon cancer cells and Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** Colon cancer cell line HCT116 were treated with different concentrations of ginsenoside Rg3, and the cells treated with DMSO were served as solvent control. Crystal violet staining and colony formation assay were applied to detect the anti-proliferation effect of ginsenoside Rg3 on HCT116 cells. Luciferase reporter assay was used to measure the transcriptional activity of β -catenin/Tcf4 in HCT116 cells. The protein expression levels of β -catenin and c-Myc were detected by Western blotting. Immunofluorescent assay was used to observe the effect of ginsenoside Rg3 on nuclear translocation of β -catenin in SW480 cells. **Results** Ginsenoside Rg3 could inhibit the proliferation of HCT116 cells at the concentration of 60 $\mu\text{mol/L}$ (*vs* control, $P < 0.05$), and this result was confirmed by colony formation assay in HCT116 cells. The transcriptional activity of β -catenin/Tcf4 in HCT116 cells was inhibited by ginsenoside Rg3 at the concentration of 25 $\mu\text{mol/L}$ (*vs* control, $P < 0.05$). The protein expression of c-Myc was down-regulated by ginsenoside Rg3, which had no obvious effect on the protein expression of β -catenin in HCT116 cells. The nuclear translocation of β -catenin was blocked by ginsenoside Rg3 in SW480 cells. **Conclusion** Ginsenoside Rg3 can inhibit the proliferation of colon cancer cells through inhibiting Wnt/ β -catenin signal transduction by blocking the nuclear translocation of β -catenin.

[Key words] ginsenoside Rg3; colon cancer cells; proliferation inhibition; nuclear translocation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81074162) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5129). Corresponding author: He Baicheng, E-mail: hebaicheng99@yahoo.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81074162);重庆市自然科学基金(CSTC 2011BB5129)

[通信作者] 何百成, E-mail: hebaicheng99@yahoo.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1706.008.html> (2013-01-31)

结肠癌是一种常见癌症,其发病与遗传或某些管家基因突变有关^[1]。人类结肠癌中有近 80% 与腺瘤性结肠息肉(adenomatous polyposis coli, APC)突变有关,另外约 20% 与 β -catenin 突变有关。因此,异常活化的 Wnt/ β -catenin 信号在结肠癌的发生过程中具有

重要作用^[2-4]。近年来,由于对结肠癌发病机制的研究及诊断和治疗手段的发展,使得结肠癌的治疗有了很大的发展,但治疗效果仍不十分理想。传统的化疗药物多是增殖依赖的细胞毒性药物,具有较严重的不良反应。将传统化疗药物与其他非细胞毒性类天然化合物联合应用不仅能增强疗效,并且能降低药物的不良反应,具有广阔的应用前景。通常认为人参皂甙的主要活性成分是 Rg3、Rh2 及 Rg5 等^[5]。有报道认为人参具有抗肿瘤作用,可能是由于其具有免疫调节活性的原因^[6]。但研究显示人参皂甙亦具有直接的抗肿瘤特性,如 Rg3、Rh2 等具有抑制增殖和抗血管生成活性,其机制可能通过抑制 NF- κ B 信号,抑制肿瘤细胞增殖并诱导凋亡^[7-8]。人参皂甙具有多种生物活性,因此其抗肿瘤活性也可能是多作用的共同结果,但具体机制仍不十分清楚。本研究主要通过体外实验研究 Rg3 对人结肠癌细胞增殖的抑制作用及可能的机制。

1 材料与方 法

1.1 试剂及细胞培养

人结肠癌细胞 HCT116 和 SW480 细胞购自 ATCC (American Type Culture Collection), Rg3 购自天然化合物 Delta 信息中心(中国,宣城), DMSO 为溶剂,购自北京索宝来科技有限公司, ACS 级。实验所用抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司, Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司, 采用 McCoy's 5A 培养基培养细胞(含 10% 胎牛血清、100 U/mL 的青霉素及 100 μ g/mL 的链霉素), 培养条件为 5% 的 CO₂ 及 37 $^{\circ}$ C。

1.2 结晶紫染色检测细胞增殖实验

将指数生长的细胞种于 24 孔板,按实验分组用不同浓度的 Rg3(40、60、100、150 μ mol/L)处理细胞。72 h 后进行结晶紫染色,检测细胞增殖情况。方法如下:弃培养基,用 PBS 小心清洗孔板 1 次。每孔加入 500 μ L 结晶紫饱和溶液(用 PBS 缓冲的 10% 甲醛配制),在室温下孵育 20 min。移去结晶紫染液,用 PBS 小心清洗 3 次。将孔板在室温下晾干后进行扫描。每孔用 500 μ L 10% 乙酸溶液溶解结晶紫并轻微振摇。待结晶紫完全溶解后,在 590 nm 下测定光密度值[D(590)]。每组实验重复 3 次,结果取平均值。

1.3 集落形成实验

参照文献[9]进行,将 HCT116 细胞先用 Rg3(60、100 μ mol/L)处理,对照组用相同体积的 DMSO。18 h 后,将细胞用胰酶消化并重新种于 6 孔板(2 000 个/孔),2 周后进行克隆形成检测。方法如下:弃培养基并且 PBS 清洗 1 次后用甲醇固定,然后用亚甲蓝(0.04%)进行染色。

1.4 pTOP-Luc 报告质粒检测 β -catenin/Tcf4 转录活性

将指数生长状态的细胞种于 T25 培养瓶中,待细胞贴壁后,用 Lipofectamine 转染 pTOP-Luc 报告质粒^[10-11],质粒量按

3 μ g/T25 标准使用,4 h 后换液。12 h 后将细胞消化重新种于 24 孔板,细胞贴壁后加入不同浓度 Rg3(25、50、100 μ mol/L)或相同体积的 DMSO。36 h 后,裂解细胞并按照试剂盒(Promega)说明进行荧光素酶活性测定。BCA 法测定总蛋白浓度,用于对荧光素酶活性进行校正。荧光素酶相对活性用各实验组测定值与对照组测定值的比值表示,间接反映信号通路的激活程度。

1.5 Western blot 实验

将指数生长的细胞种于 6 孔板中,待细胞贴壁后加入相应浓度的 Rg3(60、100 μ mol/L)或 DMSO。24 h 后,提取各组总蛋白,采用 BCA 法测定总蛋白浓度。按常规方法进行 Western blot 操作,最后采用 ECL 化学发光法显色并成像。每组实验重复 3 次。

1.6 免疫荧光染色实验

将指数生长的 SW480 细胞种于 24 孔板,待细胞贴壁后分别加入不同浓度的 Rg3 或相同体积的 DMSO 处理 1 h。弃培养基,用甲醇(-20 $^{\circ}$ C)固定细胞 15 min, PBS 清洗两次,0.1% Triton X-100 处理 15 min。再用 3% BSA 在室温下封闭 1 h,然后用 β -catenin 抗体或小鼠 IgG 孵育 1 h。最后用抗鼠荧光二抗孵育 30 min,并用 Hoechst 33258 处理 10 min,荧光倒置显微镜下成像。

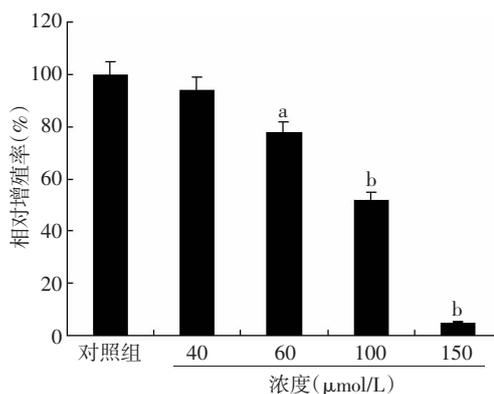
1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Microsoft Excel 进行统计分析,及利用 *t* 检验进行组间比较。

2 结 果

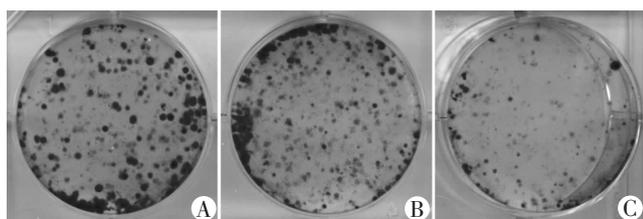
2.1 Rg3 抑制人结肠癌 HCT116 细胞的增殖和集落形成

结晶紫染色结果显示,人参皂甙 Rg3 对 HCT116 细胞的增殖具有抑制作用(图 1),这种作用随药物浓度增加而更明显,在药物浓度为 60 μ mol/L 时,Rg3 就能明显抑制 HCT116 细胞增殖(与对照组相比, $P < 0.05$);同时在集落形成实验中,Rg3 亦能明显抑制 HCT116 细胞集落形成(图 2)。提示 Rg3 能抑制人结肠癌 HCT116 细胞增殖。



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较

图 1 不同浓度的 Rg3 对人结肠癌 HCT116 细胞增殖的影响

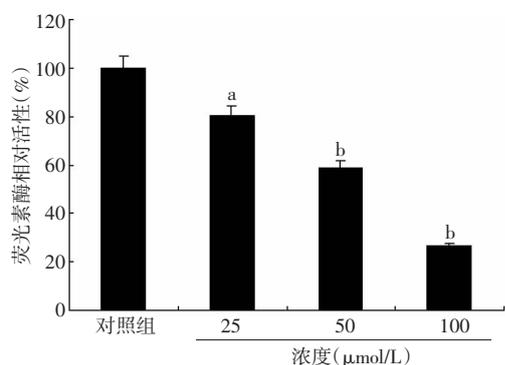


A: 对照组; B: 60 μmol/L; C: 100 μmol/L

图2 不同浓度的 Rg3 对人结肠癌 HCT116 细胞集落形成的影响

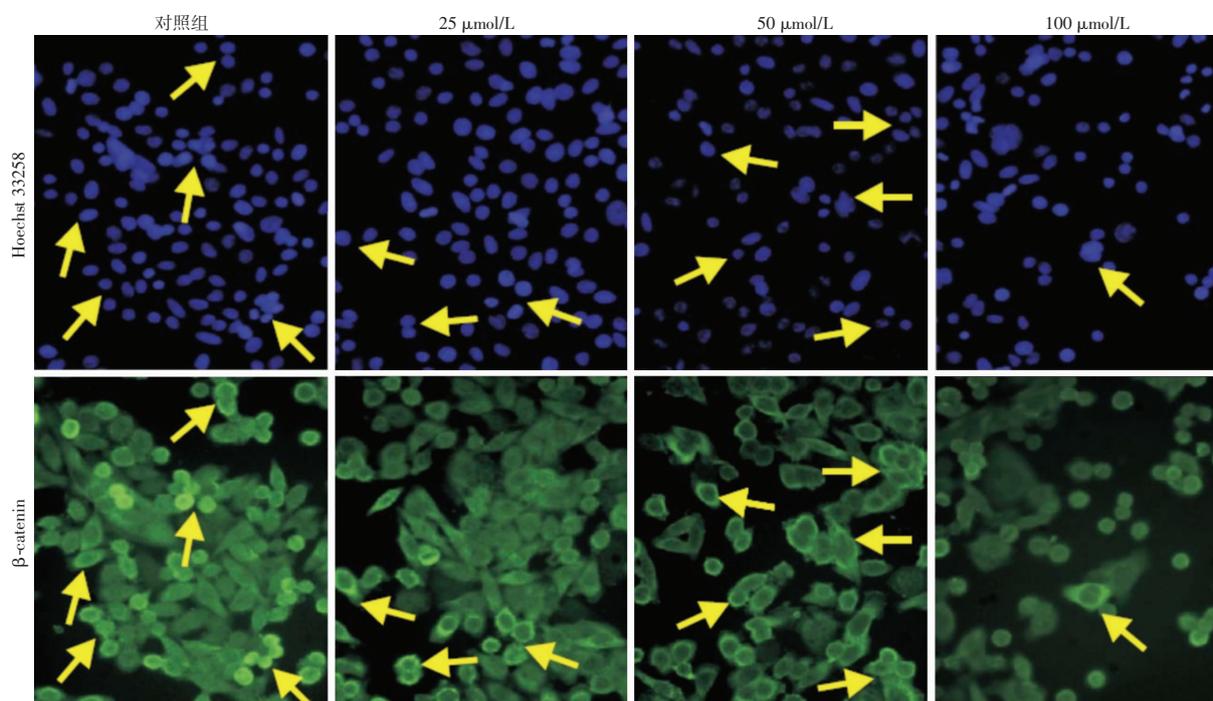
2.2 Rg3 降低 pTOP-luc 报告质粒在人结肠癌 HCT116 细胞中的荧光素酶活性

实验结果显示(图3),用 Rg3 处理 HCT116 细胞 36 h 后,能降低 pTOP-luc 报告质粒荧光素酶活性,这种作用随药物浓度增加更明显。与对照组相比,Rg3 在 25 μmol/L 就能明显降低荧光素酶活性($P < 0.05$)。提示 Rg3 对 Wnt/ β -catenin 信号传导具有抑制作用。



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较

图3 不同浓度的 Rg3 在 HCT116 细胞中对 pTOP-Luc 报告质粒荧光素酶活性的影响

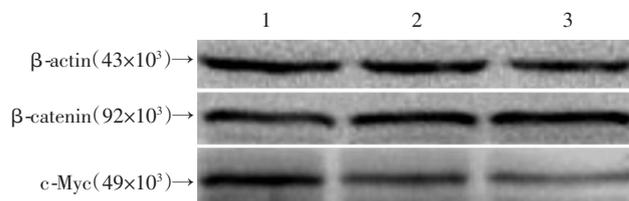


↑: β -catenin 染色阳性细胞

图5 免疫荧光检测不同浓度的 Rg3 对人结肠癌 SW480 细胞中 β -catenin 核转移的影响 ($\times 100$)

2.3 Rg3 明显降低 HCT116 细胞中 C-Myc 蛋白的表达水平

Western blot 结果显示(图4),Rg3 对 HCT116 细胞中 c-Myc 蛋白表达具有抑制作用,但对 β -catenin 蛋白水平却没有明显影响。提示在结肠癌细胞中,Rg3 降低 β -catenin/Tcf4 的转录活性可能与降低 β -catenin 蛋白水平无关。



1: 对照组; 2: 60 μmol/L; 3: 100 μmol/L

图4 Western blot 检测不同浓度 Rg3 对 HCT116 细胞 β -catenin、c-Myc 蛋白的表达

2.4 Rg3 抑制人结肠癌 SW480 细胞中的 β -catenin 核转移

免疫荧光结果显示(图5),Rg3 对人结肠癌 SW480 细胞中 β -catenin 的核转移具有明显抑制作用, β -catenin 本身在经典的 Wnt 信号传导中具有重要作用。以上结果提示,在人结肠癌细胞中,Rg3 可能通过阻止 β -catenin 核转移从而抑制 β -catenin/Tcf4 转录活性。

3 讨论

本研究通过体外实验发现,人参皂甙 Rg3 参能抑制人结肠癌 HCT116 细胞增殖,其作用机制可能与阻止 β -catenin 核转移有关。

结肠癌是一种发病率和致死率均较高的恶性肿瘤,对人类健康的危害较大,全球每年约有50万患者死于结肠癌^[12]。目前对结肠癌的诊断和治疗水平都有较大提高,但预后仍不乐观。传统植物药来源的有效成分在治疗各种肿瘤中发挥着重要作用^[13]。

人参作为中药已有数千年的历史,Rg3是从人参中分离出的单一成分。人参具有抗肿瘤作用,但通常认为这种作用是由于人参对免疫功能的调节所致^[6]。近年来的研究表明从人参中提取的有效成分具有直接抗肿瘤活性^[7-8];Rg3作为人参的主要成分之一,具有抗增殖及抗血管生成的作用^[14]。文献^[15]报道,Rg3对氧化偶氮甲烷(azoxymethane,AOM)诱导的结肠癌具有抑制作用,而AOM能诱导 β -catenin突变;但是,Rg3对结肠癌细胞增殖抑制作用与抑制Wnt/ β -catenin信号转导的关系尚不十分清楚。

目前认为,Wnt信号异常活化是结肠癌的重要发病原因之一^[2]。Wnt信号可分为经典的Wnt信号通路和非经典的Wnt信号通路,在胚胎发育及个体正常生理功能调节中具有重要作用。 β -catenin在经典的Wnt信号通路中具有重要作用。通常情况下,Wnt内源性配体与细胞膜上的卷曲蛋白结合后,导致 β -catenin降解复合物Axin-APC-GSK3 β 不能形成,抑制 β -catenin降解,使其在胞内聚集,然后转位入核,实现对下游靶基因的调节,如C-Myc等^[16]。在结肠癌细胞中,因 β -catenin或APC蛋白发生突变,导致 β -catenin不被降解而转位入核,引起Wnt/ β -catenin信号持续活化。结果导致某些原癌基因过度表达,引起细胞无限制增殖。因此,Wnt/ β -catenin成为治疗结肠癌药物的重要靶点之一。

研究结果显示,Rg3能抑制人结肠癌HCT116细胞增殖,并抑制 β -catenin/Tcf4的转录活性,同时明显降低下游靶基因c-Myc的表达。由于HCT116细胞中存 β -catenin突变,所以导致 β -catenin无法被降解而聚集在胞内,进而转位入核,活化Wnt/ β -catenin信号。这一现象表明Rg3对 β -catenin/Tcf4转录活性的抑制作用,可能与促进 β -catenin的降解无明显关系。因此,我们推测Rg3可能对 β -catenin的核转移具有抑制作用。为验证这种作用的可能性,本研究采用另一种人结肠癌细胞株SW480进行实验。因为在SW480细胞中存在APC突变,这就导致降解 β -catenin的复合物Axin-APC-GSK3 β 无法正常形成。最终结果是 β -catenin在SW480细胞中聚集并转位入核,从而活化Wnt/ β -catenin信号。免疫荧光结果显示,在SW480细胞中Rg3可以抑制 β -catenin核转移,并且这种作用随药物浓度增加而增强。

本实验表明,Rg3能抑制人结肠癌细胞的增殖,其

机制至少与阻止 β -catenin核转移有关,但Rg3对 β -catenin核转移抑制的具体作用机制还清楚。本课题组将进一步研究分析Rg3抑制 β -catenin核转移的可能机制,为将Rg3用于结肠癌的治疗提供理论及实验基础。

参考文献:

- [1] Wu Z Q, Brabletz T, Fearon E, et al. Canonical Wnt suppressor, Axin2, promotes colon carcinoma oncogenic activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(28): 11312-11317.
- [2] Ionov Y, Peinado M A, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis[J]. Nature, 1993, 363(6429): 558-561.
- [3] Lynch H T, de-la-Chapelle A. Hereditary colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348(10): 919-932.
- [4] Rowley P T. Inherited susceptibility to colorectal cancer[J]. Annu Rev Med, 2005, 56: 539-554.
- [5] Qi L W, Wang C Z, Yuan C S. American ginseng: potential structure-function relationship in cancer chemoprevention[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(7): 947-954.
- [6] Lu P, Su W, Miao Z H, et al. Effect and mechanism of ginsenoside Rg3 on postoperative life span of patients with non-small cell lung cancer[J]. Chin J Integr Med, 2008, 14(1): 33-36.
- [7] Kim S M, Lee S Y, Cho J S, et al. Combination of ginsenoside Rg3 with docetaxel enhances the susceptibility of prostate cancer cells via inhibition of NF-kappaB[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 631(1/3): 1-9.
- [8] Yuan C S, Wang C Z, Wicks S M, et al. Chemical and pharmacological studies of saponins with a focus on American ginseng[J]. J Ginseng Res, 2010, 34(3): 160-167.
- [9] Meng L H, Zhang H, Hayward L, et al. Tetrandrine induces early G1 arrest in human colon carcinoma cells by down-regulating the activity and inducing the degradation of G1-S-specific cyclin-dependent kinases and by inducing p53 and p21Cip1[J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 9086-9092.
- [10] Genini D, Garcia-Escudero R, Carbone G M, et al. Transcriptional and Non-Transcriptional Functions of PPAR β / δ in Non-Small Cell Lung Cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46009.
- [11] 何百成,康全,杨俊卿,等.小檗碱抗肿瘤作用与Wnt/ β -catenin信号转导关系[J].中国药理学通报,2005,21(9):1108-1111.
- [12] Merika E, Saif M W, Katz A, et al. Review. Colon cancer vaccines: an update[J]. In Vivo, 2010, 24(5): 607-628.
- [13] Li B, Zhao J, Wang C Z, et al. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis and paraptosis-like cell death in colorectal cancer cells through activation of p53[J]. Cancer Lett, 2011, 301(2): 185-192.
- [14] Liu T G, Huang Y, Cui D D, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with gemcitabine on angiogenesis and growth of lung cancer in mice[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 250.
- [15] Iishi H, Tatsuta M, Baba M, et al. Inhibition by ginsenoside Rg3 of bombesin-enhanced peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane in Wistar rats[J]. Clin Exp Metastasis, 1997, 15(6): 603-611.
- [16] Jiang J, Griffin J D. Wnt/ β -catenin Pathway Modulates the Sensitivity of the Mutant FLT3 Receptor Kinase Inhibitors in a GSK-3 β Dependent Manner[J]. Genes Cancer, 2010, 1(2): 164-176.

(收稿:2012-11-12;修回:2013-01-15)

(编辑 栾嘉)